

グルコースオキシダーゼ/キチン-白金修飾カーボン ペースト電極におけるカーボン粉末の形状の評価†

菅原一晴*, 木暮康行**

Effect of Carbon powdered form on Carbon paste electrode modified with Glucose oxidase/Chitin-Pt†

Kazuharu Sugawara* and Yasuyuki Kigure**

In the present study, a carbon paste electrode modified with chitin and platinum powders was constructed to evaluate features of graphite powder. Pyrolytic graphite, spherical graphite, and artificial graphite were selected to fabricate the electrode. In order to evaluate the property of the graphite powder, glucose sensor with the graphite powder was developed. After glucose oxidase was immobilized to the chitin powder on the electrode surface due to an electrostatic interaction, the electrode response of the hydrogen peroxide produced from glucose was measured. The properties of the graphite powders were monitored by the electrode response. As a result, the greatest response was obtained by the electrode with the artificial graphite. The electrode was applied to evaluate the amount of chitin, the immobilization time of the glucose oxidase, and the concentration of the enzyme. Because the chitin and platinum powders were contained in the electrode surface only, voltammetric measurements of glucose were carried out in small amounts of platinum powder.

Key words : Graphite powder, Carbon paste electrode, Chitin, Glucose oxidase, Platinum

1 はじめに

生体高分子はタンパク質や多糖類などの機能的な高分子化合物である。これらは生体適合性が高く、生体高分子間における特異的な反応を生じることがある。また、多数のリガンド、金属イオン、錯体との相互作用を有する。その中でタンパク質は多数のアミノ酸残基から構成されており、酵素や構造タンパク質、受容体タンパク質など、数多くの種類が存在している。例えば、特定物質の輸送や分解、生成、認識など、身体機能の調節に深く関わっている。また、多糖類は単糖が多数結合している構造をしており、生物のエネルギー源として必要不可欠な存在となっている。それゆえ、生体高分子はバイオセンサの開発に寄与しており¹⁾、細胞培養の足場²⁾としての機能をもち多くの研究が報告されている。

上述の多糖類の一つであるキチンは、*N*-アセチル-D-グルコサミンが鎖状に繋がった構造をしている。このキチンはカニの甲羅やキノコの細胞質などに存在しており、自然界では年間 1000 億トン生産されていると言われており、化学的、物理的に非常に安定であり、生体適合性も高いため、人工皮膚や縫合糸などの医療関係のツールとして利用されている³⁾。しかしながら、キチンはその

安定性のため通常の溶液中ではほとんど溶解せず、ジメチルホルムアミド-塩化リチウムなどの特殊な溶媒を使用しないと溶かすことができない。それに対してキチンを脱アセチル化したキトサンは弱酸性の溶液などに溶け、キチンより扱いやすくなっている。キトサンを用いた例に、キトサン-ドーパミン/MWCNTs(multiwalled carbon nanotubes) 複合体を金電極に修飾した NADH センサ⁴⁾や、MWCNT-キトサン-白金複合体に酵素を固定させたコレステロールセンサ⁵⁾が挙げられる。一方、キチンを用いた研究として、バイオセンサの支持体を運用したものがあ。キチンのモノマーである *N*-アセチル-D-グルコサミンの 2 位に結合しているアセチルアミド基は、弱酸性溶液中においてプロトン化する。正電荷を有したキチンは負に帯電した生体高分子と静電的に結合することができる。この原理を利用することで、キチンに酵素を固定化したバイオセンサが提案されてきた⁶⁾。

代表的な酵素の一つであるグルコースオキシダーゼ(GOD, EC1.1.3.4)は分子量 15~18 万の酸化酵素である。主にカビの液体培養によって取り出される。二量体を形成しており、補酵素に FAD を持っている。等電点は pH 4.2 で、それ以上の pH だと負に帯電するため、弱酸性溶液中

† 原稿受理 平成 26 年 2 月 28 日 Received February 28, 2014

* 教職センター(Teaching Profession Center)

** 群馬大学教育学部(Faculty of education, Gunma University)

においてキチンと静電的に結合する。GOD はグルコースを酸化させ、グルコノラクトンと過酸化水素に変換させる働きを持っている。このとき生じる過酸化水素の電極応答を測定することで、間接的にグルコースの濃度を測定することができる。この方法以外にも、グルコースの酸化時に消費される酸素を、酸素電極を用いて測定することが、グルコースを測定する方法として提案されている⁷⁾。GOD は他の酵素に比べると安価で安定性があり、グルコースに対する選択性も非常に高いため、酵素のモデルとして用いられている⁸⁾。例えば、GOD が固定化された金ナノロッド修飾白金電極⁹⁾や硫化カドミウム修飾熱分解黒鉛電極¹⁰⁾などがあり、それぞれ高感度なバイオセンサが開発されている。

比較的容易に作製できる電気化学的センサとして、カーボンペースト電極(CPE)がある。CPEは炭素粉末とバインダーを混ぜたカーボンペースト(CP)を電極の空孔に詰めて使用する電極である。CPEは優れた特徴を持っており、残余電流がグラッシーカーボン電極より小さいことや、電極表面を測定ごとに容易に再生でき、履歴の影響が少ないことなどが挙げられる。さらにCPに分子認識機能や触媒認識機能を持った物質を容易に修飾することができるので、電極自体に様々な機能をもたせることができる。CPEを修飾した研究例には、GODやチロシナーゼを固定した磁性粒子をCPに修飾して、高感度なCPEのバイオセンサを作製した研究^{11, 12)}、ペルオキシダーゼを固定したキトサンを修飾して、ロズマリン酸を検出した例¹³⁾、ニッケル/ポリアミドフェノールを修飾して酵素を使用せずにグルコースを検出した報告などがある¹⁴⁾。

これまで研究としては、グラッシーカーボン(GC)粉末にキチンと白金を混合し、GODを固定したCPEを作製した¹⁵⁾。GC粉末は優れた電気伝導性と安定性、生体適合性を有しており、他のカーボンよりも電気化学的測定に適していると考えられている。その特性を評価するためにグルコースの応答を測定することによって、GC粉末の粒径やキチンの含有量が測定にどのような影響を及ぼすか考察した。その結果、GC粉末では粒径の増大とともに電流値の増加が観察された。キチンの含有量に関しては12~13%前後までは含有量の増大による電流値の増加が見られたが、それ以上の含有量だと電流値の値は減少していった。この研究ではGCの粒径に関する考察を行っているが、それらの形状についてもGODセンサの性能に影響するものと考えられる。

本研究では電極の表層のみをキチンと白金で修飾したCPEを作製し、電極表面上にGODを固定した後にグルコースの応答を測定した。表層に修飾するカーボン粉末はそれぞれ形状の異なる、鱗片状の熱分解黒鉛(Pyrolytic graphite, PC)、球状の球状黒鉛(Spherical Graphite, SG)、不定形の人造黒鉛(Artificial Graphite, AG)を用いた。それぞれの黒鉛で作製した電極を用いることによって、カーボン粉末の形状による測定への影響を考察した。そして、最も大きな応答を示した黒鉛粉末において、キチンの含有量や固定時間、酵素の濃度がどの

ような影響を測定に与えるかを観察した。また、表面のみをキチンとPtで修飾することで、高価な物質であるPtの少量化を図った。

2 実験

2・1 測定装置

全てのサイクリックボルタンメトリーでALS/[H] CH Instrument Electrochemical Analyzer Model 612Bを使用した。また、マグネティックスターラーはADVANCE SR50を使用した。作用電極はCPE(BAS製)、参照電極はAg/AgCl電極(Model No. 012167, BAS製)、対極は白金線をそれぞれ用いた。

2・2 試薬

炭素粉末は東海カーボン(株)から供給された。黒鉛粉末PC(5, 10, 30 μm)、SG(8, 20, 30 μm)、AG(5, 10, 20 μm)は伊藤黒鉛工業(株)から購入した。Chitin(K-02)はフナコシ(株)のものを用いた。白金粉末(354010)はニラコ(株)社製であった。D(+)-glucose(10017-00)は関東化学(株)から購入した。Glucose oxidase(EC 1.1.3.4)(074-02401)は和光純薬工業(株)社製を使用し、他の試薬は分析用試薬であった。

2・3 溶液調製

リン酸緩衝溶液(PB, 0.1 M, pH 5.8)はリン酸二水素カリウム水溶液(0.1M)と水酸化ナトリウム水溶液(0.1 M)を9:1の割合で混合したものである。グルコースは9 mgを5 mlのPBに溶解させ、 1.0×10^{-2} Mに調製した。GODは170 unit/mgを24 mg量りとり、750 μl のPBに溶解して、600 unit/mlに調製をした。

2・4 実験操作

最初に時計皿の上にカーボン粉末を0.050 g量りとり、そこに0.025 gのヌジョールを加える。炭素とヌジョールをスパチュラと乳棒で混合し、CPの一部を電極の空孔に詰める。次に、時計皿の上に白金を0.008 g、キチン0.006 g、カーボン粉末を0.036 gの順で量りとり、そこにヌジョール0.025gを加える。このときキチンと白金を修飾するカーボン粉末はPC, SG, PCをそれぞれ使用する。各ペーストをスパチュラと乳棒で混合し、キチンと白金を修飾したCPを電極の表面に塗る。葉包紙の上で電極表面を研磨し、キムワイプで表面の周りを拭いてから、回転子を入れたGOD溶液(600 unit/ml)に電極を浸す。マグネティックスターラーでGOD溶液を1時間攪拌して、電極表面上に修飾したキチンにGODを固定させる。電極を取り出してPBで洗浄し、PBが10 ml入ったセルに参照電極と対極とともに取り付ける。

ブランクの測定は電流値が一定値になるまで行う。次に、2分間攪拌した後に再びブランクを測定する。その後、溶液の中に 1.0×10^{-2} Mのグルコース100 μl を各々5回加え、2分間攪拌した後に測定を行う。

2・5 測定原理

キチンはpH 5.8の溶液中においてプロトン化している。一方でGODはpH 5.8付近で負に帯電しており、キチンとGODはpH 5.8の溶液中で静電的に結合することがで

きる。その性質を利用して、キチン-白金修飾 CPE 電極を GOD 溶液に浸し、キチンに GOD を固定化した。GOD/キチン-白金修飾 CPE 電極を PB 溶液に浸し、グルコースを加えると、キチンに固定化された GOD 上でグルコースの酸化反応が起こる。グルコースは酸化されると、グルコノラクトンと過酸化水素を生成する。過酸化水素は水溶液中では安定な物質であるが、白金や銅、鉄、ニッケルなどの金属と接触すると不安定な状態になる。電極には白金が修飾されているので、白金上で過酸化水素の電極応答を測定することが可能になる。これにより、間接的にグルコースを検出が行うことができる。

3 結果と考察

3・1 グルコースの測定

カーボン粉末 AG 20 μm を用いて作製した電極で得られたボルタモグラムが Fig. 1 である。グルコース濃度を 2.0×10^{-4} M とすると 0.55~0.60 V 付近に過酸化水素のピークが現れ、 5.0×10^{-4} M グルコースを含む溶液中での電流値もその濃度に依存した形になっている。これは電極表面上でグルコースが電極表面で酸化され、過酸化水素が電極応答していることを示している。よって、電極表面のみを修飾した CPE でもグルコースの測定を行えることが見出され、Pt の使用量を少量化が達成された。

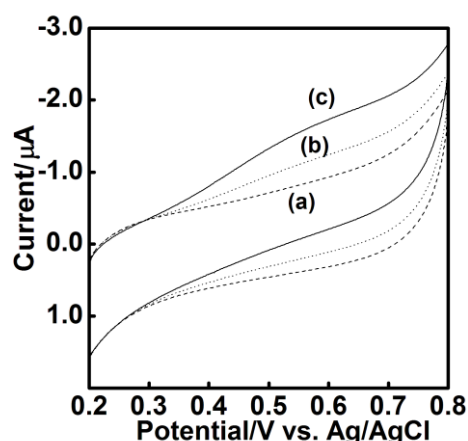


Fig. 1 Voltammograms of glucose using chitin/Pt-modified CPE with GOD.

(a) Blank, (b) 2.0×10^{-4} M Glucose, (c) 5.0×10^{-4} M. An electrode containing 12.5 % chitin, 15 % platinum and 72.5 % artificial graphite powder (20 μm) was immersed in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.8) with GOD (600 unit/ml) for 1h. Measurements were performed in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.8) using the electrode.

3・2 形状と粒径の異なるカーボン粉末での測定

PC (粒径 5, 10, 30 μm), SG (粒径 8, 20, 30 μm), AG (粒径 5, 10, 20 μm) を用いた時のそれぞれのピーク電流値との関係が Fig. 2 である。PC を用いた実験では粒径による電流値の変化はほとんど観察されなかったが、SG や

AG を用いた実験では粒径の増大に伴う電流値の増加が認められた。その中でも AG は SG より大きな電流値を示した。これらの要因の一つとして、キチンに対する GOD の固定化量がある。GOD の固定化量はカーボン間の間隙によって影響され、GOD の固定化量によって電流値が依存する。鱗片状の形状をしている熱分解カーボンは配向性が高く、規則正しく重なりやすいので、粒径が大きくなっても全体的な間隙がほとんど増えない。そのため粒径が増大しても GOD の固定化量が増えず、電流値の変化がほとんどなかったものと考えられる。PC とは異なり球状の SG や不定形の AG では粒径の増大に伴って、カーボン間の間隙が大きくなるため、電流値が大きくなったと推測される。特に、AG は SG より高い電流値を示している。これは AG が不定形なので、カーボン間の間隙が大きくなり、GOD の固定化量が増加することに起因するものと考えられる。

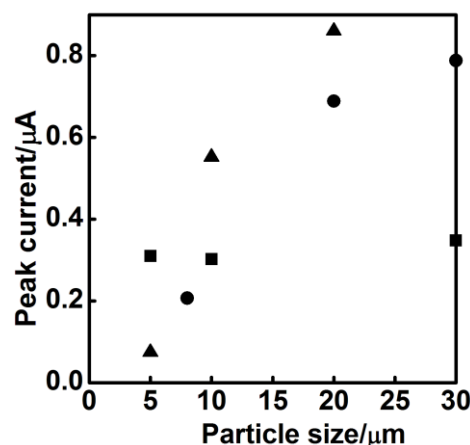


Fig. 2 Relations between shape and particle size of carbon powder.

▲:AG, ●:SG, ■:PC. An electrode containing 12.5 % chitin, 15 % platinum and 72.5 % graphite powder was immersed in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.8) with GOD (600 unit/ml) for 1h. Measurements were performed in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.8) containing 5.0×10^{-4} M glucose using the electrode.

3・3 キチンの含有量の影響

キチンの含有量を 0 から 15 % に変化させたときの結果を Fig. 3 に示す。キチンの含有量が増すごとに電流値が増加していくことが確認できる。キチンが 0 % の状態でもグルコースの応答がわずかに現れているが、これは GOD がヌジョールに少しだけ溶解しているためだと予想される。Figure 3 においては、キチンの含有量が 15 % で最も高い電流値を示しているが、電極表面が非常に脆くなり、電極応答が不安定となる。含有量 12.5 % 前後は電極表面上が 15 % よりも安定しており、再現性が高く電気化学的測定に適していると考えられる。

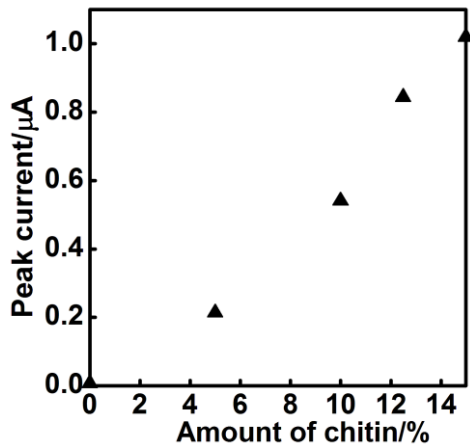


Fig. 3 Influence of amount of chitin.

An electrode containing X % chitin, 15 % platinum and (85-X) artificial graphite powder (20 μm) was immersed in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.8) with GOD (600 unit/ml) for 1h. Measurements were performed in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.8) containing 5.0×10^{-4} M glucose using the electrode.

3・4 GODの固定時間の依存性

Figure 4 は GOD の固定時間を 0 から 60 分に変化させたときの各電流値との関係である。GOD の固定時間が変化しても電流値がほとんど変わらないことがわかる。これは GOD 溶液の濃度が高いために、早い段階でキチンのアセチルアミド基に結合する GOD が飽和したためだと考えられる。GOD を固定するための濃度を低くすれば、電流値の変化を観察することが可能となることが予想される。

3・5 GODの固定化における濃度の効果

酵素濃度を変化させたときのグラフが Fig. 5 である。酵素濃度を変化させても、電流値の増加はほとんど見られなかった。これは電極表面への GOD の固定化時間が十分であったため、キチンと GOD との結合がすぐに飽和状態になったためである。固定化時間を短くするならば、電流値の増加を観察されるものと考えられる。

4 まとめ

本研究では、カーボン粉末の形状がグルコースの測定に影響を与えるかどうかを評価した。鱗片状の PC では、SG と AG とは異なり、粒径が増大しても電流値の増加はほとんど見られなかった。球状の SG と不定形の AG では粒径の増大に伴い電流値も増加したが、その中でも AG 20 μm で最も高い電流値を示していた。これは AG が不定形であることが原因だと考えられる。この結果から GOD/キチン-Pt 修飾 CPE におけるグルコースの測定に最も適しているのは AG 20 μm であると予想される。その AG 20 μm において、GOD を固定するための濃度や固定時間を変化

させたが、電流値が大きく変化することはなかった。これは GOD を固定するための濃度や固定時間のみを変化させたことが原因である。濃度と固定化時間の二つを変化させることによって、電流値が変化するのではないかと考えられる。また全ての測定において、表面のみキチンと白金を修飾した CPE を使用していることから、白金の少量化が可能であることが明らかになった。

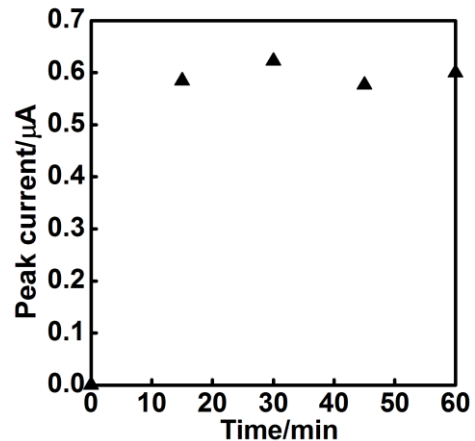


Fig. 4 Influence of immobilization time.

An electrode containing 12.5 % chitin, 15 % platinum and 72.5 % artificial graphite powder (20 μm) was immersed in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.8) with GOD (600 unit/ml). Measurements were performed in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.8) containing 5.0×10^{-4} M glucose using the electrode.

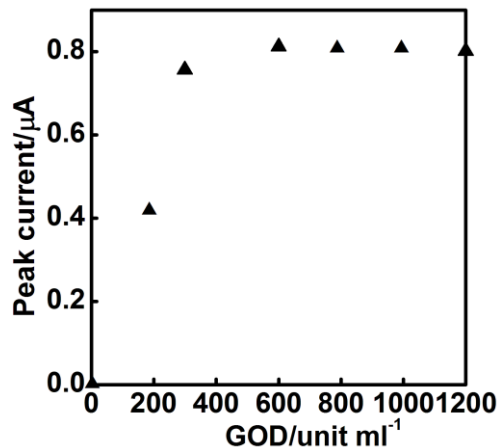


Fig. 5 Effect of concentration in immobilization of GOD.

An electrode containing 12.5 % chitin, 15 % platinum and 72.5 % artificial graphite powder (20 μm) was immersed in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.8) with GOD for 1h. Measurements were performed in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.8) containing 5.0×10^{-4} M glucose using the electrode.

参考文献

- 1) U. B. Trivedi, D. Lakshminarayana, I. L. Kothari, P. B. Patel, and C. J. Panchal, *Sens. Actuat. B Chem.* 136, 45 (2009).
- 2) N. Nwe, T. Furuike, and H. Tamura, *Process Biochem.* 45, 457 (2010).
- 3) R. S. Jayasree, K. Rathinam, and C. P. Sharma, *J. Biomater. Appl.* 10, 144 (1995).
- 4) B. Ge, Y. Tan, Q. Xie, M. Ma, and S. Yao, *Sens. Actuat. B. Chem.* 137, 547 (2009).
- 5) Y. C. Tsai, S. Y. Chenand, and C. A. Lee, *Sens. Actuat. B Chem.* 135, 96 (2008).
- 6) B. Krajewska, *Enzyme. Microbial. Techn.* 35, 126 (2004).
- 7) J. C. Armour, J. Y Lucisano, B. D. McKean, and D. A. Gough, *Diabetes* 39, 1519 (1990).
- 8) J. Raba and H. A. Mottola, *Anal. Chem.* 25, 1 (1995).
- 9) X. Ren, D. Chen, X. Meng, F. Tang, A. Du, and L. Zhang, *Colloid. Surface.B* 72, 188 (2009).
- 10) Y. Huang, W. Zhang, H. Xiao, and G. Li, *Biosens. Bioelectron.* 21, 817 (2005).
- 11) J. Li, X. Wei, and Y. Yuan, *Sens. Actuat. B. Chem.* 139, 400 (2009).
- 12) Z. Liu, Y. Liu, H. Yang, Y. Yang, G. Shen, and R. Yu, *Anal. Chim. Acta* 533, 3 (2005).
- 13) K. D. S. Maguerroski, S. C. Fernandes, A. C. Franzoi, and I. C. Vieira, *Enzyme Microbial. Tech.* 19, 400 (2008).
- 14) R. Ojani, J-B. Raof, and S. Fathi, *Electroanalysis* 20, 1825 (2008).
- 15) K. Sugawara, A. Yugami, N. Terui, and H. Kuramitz, *Anal. Sci.* 25, 1365 (2009).